

Procjena moguće izloženosti okratoksinu A putem konzumacije kontaminiranih mesnih proizvoda

Vulić¹, A. N. Peršić^{2*}, N. Vahčić², B. Hengl³, A. Gross-Bošković³, M. Jurković³, D. Kovačević⁴, J. Pleadin¹

znanstveni rad

Sažetak

Okratoksin A je sekundarni toksični metabolit kojeg proizvode plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. Podaci ukazuju na učestalu kontaminaciju okratoksinom A žitarica i proizvoda od žita te posljedično moguću kontaminaciju mesa i mesnih proizvoda. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi moguću razinu izloženosti potrošača okratoksinu A konzumiranjem tradicionalnih mesnih proizvoda kontaminiranih ovih toksinom. Uzimajući u obzir prehrabene navike i koncentracije okratoksina A u različitim mesnim proizvodima dobivenim iz sirovina tretiranih životinja, procijenjena je moguća izloženost okratoksinu A. Dobiveni rezultati pokazali su da je vjerojatnost izlaganja okratoksinu A u dozi koja je iznad TWI (120 ng/kg TM tjedno) vrlo niska. Podaci su pokazali da bi samo konzumiranjem pancete 0,8% populacije bilo izloženo okratoksinu A u dozi koja je iznad TWI vrijednosti od 120 ng/g TM tjedno, a koja je definirana od strane EFSA. Podaci za kulen, slavonsku kobasicu, šunku i dimljena rebra ukazuju da je mala vjerojatnost da će stanovništvo (prosječne tjelesne mase 70 kg) biti izloženo okratoksinu A u dozama većim od TWI ako konzumira kontaminirane proizvode.

Ključne riječi: okratoksin A, mesni proizvodi, izloženost, Tolerable Weekly Intake, ELISA

Uvod

Okratoksin A je mikotoksin, sekundarni metabolit kojeg proizvode plijesni rodova *Aspergillus* i *Penicillium*. S obzirom da istraživanja upućuju na njegovo nefrotoksično, neurotoksično, mutageno, karcinogeno, teratogeno i imunosupresijsko djelovanje kod ljudi i životinja te njegovu široku rasprostranjenost kao kontaminanta hrane i hrane za životinje, okratoksin A predstavlja zdravstveni rizik širom svijeta (Krogh i sur., 1979; Creppy, 2002; Walker i Larsen, 2005; Khoury i Atoui, 2010).

Zbog moguće prirodne kontaminacije žitarica koje ulaze u sastav krmnih smjesa namijenjenih hranidbi životinja za proizvodnju mesa, ali i moguće sekundarne kontaminacije mesnih proizvoda tijekom postupka njihove proizvodnje, na ovaj način također je moguće unošenje okratoksina A u prehrambeni lanac čovjeka (Markov i sur., 2013). S ciljem sprječavanja posljedica po ljudsko zdravlje, proizvodnju hrane i hrane za životinje potrebno je temeljiti na načelima dobre poljoprivredne i proizvođačke prakse odnosno HACCP sustavu, analizi rizika, prevenciji i kontroli kritičnih točaka te uklanjanju izvora u tehnološkom postupku proizvodnje. Isto tako, potrebno je osigurati provođenje službenih kontrola na prisustvo ovog kontaminanta te definirati njegove najveće dopuštene/preporučene količine za različite

kategorije hrane životinjskog podrijetla, ujedno i proizvoda od mesa (Peršić i sur., 2013).

Ranija istraživanja u Republici Hrvatskoj ukazala su na učestalu kontaminaciju krmiva i krmnih smjesa s okratoksinom A (Pepeljnjak i sur., 2008; Pleadin i sur., 2013). Podaci govore da ovaj toksin može biti prisutan u i mesnim proizvodima dobivenim od kontaminiranih sirovina (Madsen i sur., 1992; Gareis, 1996; Jørgensen, 1998; Creppy, 1999; Gareis i Scheuer, 2000). U ranijim istraživanjima najveća količina okratoksina A određena je u mesnim proizvodima na bazi iznutrica, kao što su krvavice i jetrenjače, zbog najveće kumulacije upravo u tkivu bubrega te jetre koja čine jestiva tkiva i predstavljaju sirovine za proizvodnju ove kategorije mesnih proizvoda (Petzinger i Weidenbach 2002; Peršić i sur., 2014). Također, objavljeni podaci govore i o kontaminaciji dimljenih i ostalih mesnih proizvoda u kojima su detektirane značajne razine okratoksina A (Pfohl-Leszkowicz i Manderville, 2007; Dall'Asta i sur. 2010; Markov i sur., 2013). Industrijski procesi proizvodnje mesnih proizvoda, poput zagrijavanja, soljenja, sušenja i skladištenja, pri tom nisu pokazali značajan utjecaj na smanjenje količine okratoksina A u finalnom mesnom proizvodu (Amezequeta i sur., 2009).

1 dr.sc. Ana Vulić, znanstvena suradnica; doc.dr.sc. Jelka Pleadin, znanstvena savjetnica; dr.sc. Nina Peršić, viši asistent, Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za analitičku kemiju, Savska cesta 143, Zagreb, Hrvatska

2 prof.dr.sc. Nada Vahčić, redoviti profesor, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska

3 dr.sc. Bigita Hengl; Andrea Gross-Bošković, dipl.ing.; Martina Jurković, dipl.ing., Hrvatska agencija za hranu, I. Gundulića 36b, Osijek, Hrvatska

4 prof.dr.sc. Dragan Kovačević, redoviti profesor, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Franje Kuhača 20, Osijek, Hrvatska

S obzirom da u Hrvatskoj postoji duga tradicija u proizvodnji autohtonih mesnih proizvoda na seoskim domaćinstvima, te da objavljeni podaci ukazuju na učestalu kontaminaciju okratoksinom A upravo proizvoda iz skupine trajnih kobasica i suhomesnatih proizvoda (Pleadin i sur., 2013), od značaja su i istraživanja izloženosti potrošača ovom kontaminantu putem konzumiranja ovih proizvoda.

Cilj ovog istraživanja bio je stoga utvrditi moguću razinu izloženosti potrošača okratoksinu A konzumiranjem tradicionalnih mesnih proizvoda kontaminiranih ovih toksinom. Istraživanje je provedeno nakon proizvodnje mesnih proizvoda iz sirovina dobivenih od svinja tretiranih okratoksinom A te analize količina okratoksina A u finalnim mesnim proizvodima. Procjena izloženosti je izvršena u odnosu na TWI (tolerable weekly intake) vrijednost od 120 ng/kg tjelesne mase, određenu od strane EFSA (European Food Safety Authority).

Materijali i metode **Tretman životinja i uzorkovanje**

Istraživanje je provedeno na ukupno 10 farmski uzgojenih svinja u tipu hibrida Zegersa, tjelesne mase oko 70 kg. Životinje su podijeljene u dvije skupine: pet svinja je tretirano sa okratoksinom A, a pet svinja nije bilo tretirano i činilo je kontrolnu skupinu. Standard okratoksina A (0,78 mg) izdavan je u želatinske kapsule ispunjene sa 100 mg laktoze i davan životinjama tijekom 30 dana. Ova količina okratoksina A jednaka je količini od 300 µg/kg okratoksina A u krmnoj smjesi, uz pretpostavku da prosječni unos hrane dnevno iznosi 2,5 kg po životinji. Nakon završetka pokusa, tretirana i kontrolna skupina životinja je žrtvovana te su prikupljene sirovine korištene u proizvodnji mesnih proizvoda. Pokus na životinjama proveden je u skladu sa važećim zakonskim odrednicama u Republici Hrvatskoj.

Proizvodnja i priprema uzoraka za analizu

Nakon prikupljanja sirovina za proizvodnju, mesni proizvodi proizvedeni su na obiteljskom domaćinstvu po tradicionalnim recepturama opisanim u literaturi (Pavičić, 2004), a koje se često koriste u Hrvatskoj. Proizvedeno je ukupno pet vrsta tradicionalnih mesnih proizvoda i to iz skupine trajnih kobasica (kulen i slavonska kobasica) te suhomesnatih proizvoda (panceta, pršut i dimljena rebra). Po svakoj tretiranoj i kontrolnoj životinji proizvedena su dva uzorka po vrsti proizvoda (ukupno 50 uzoraka). Svi proizvodi pohranjeni su na -20 °C do provedbe analiza na okratoksin A. Tehnološki postupci proizvodnje prikazani su u okviru istraživanja Pleadin i sur. (2013). Za homogenizaciju uzoraka neposredno prije provedbe analiza korišten je homogenizator Grindomix GM 200 (Retsch, Njemačka).

Kemikalije i reagensi

Okratoksin A standard, proizvođača Acros Organics (Geel, Belgija), korišten je za tretman životinja i validaciju analitičkih metoda. ELISA metoda za kvantitativno određivanje količine okratoksina A provedena je uporabom ELISA kita Ridascreen® Ochratoxin A 30/15 (R Biopharm, Darmstadt, Njemačka). Kit sadrži mikrotitracijsku ploču s jažicama presvučenim antitijelima, standardne vodene otopine okratoksina A (0, 50, 100, 300, 900 i 1800 ng/ml), peroksidaza konjugirani okratoksin A, supstrat/kromogen (tetrametilbenzidin), stop reagens (1N sumporna kiselina) te pufer za razrjeđivanje i pufer za ispiranje (10 mM fosfat pufer, pH=7,4). Sve kemikalije korištene u pripremi uzoraka za analizu okratoksina A bile su analitičke čistoće.

Priprema uzoraka za analizu

Kobasice: U 1 g homogeniziranog mesnog proizvoda dodano je 0,5 mL 1 M H₃PO₄ i 3 mL etilacetata te jako promućkano. Nakon centrifugiranja (1 min, 2000 o/min) na sobnoj temperaturi (20-25 °C), supernatant je prenesen uz dodatak novih 3 mL etilacetata. Nakon miješanja i centrifugiranja, etilacetatni slojevi su spojeni, dodano je 3 mL 0,65 M NaHCO₃ i ostavljeno mućkati još 15 minuta. Nakon centrifugiranja (5 min, 2000 o/min), 1 mL donje vodene faze je prebačen i grijan u vodenoj kupelji na temperaturi od 100 °C tijekom 3 min. Nakon hlađenja, dodano je 4 mL destilirane vode te je alikvotni dio otopine razrijeđen sa 0,13 M NaHCO₃. 50 µL razrijeđenog uzorka korišteno je za ELISA test.

Suhomesnati proizvodi: U 1 g uzorka dodano je 6 mL etilacetata i 0,5 mL 1 M H₃PO₄, dobro izmućkano te centrifugirano pri 3000 o/min na sobnoj temperaturi. Zatim je sloj etilacetata prebačen dekantiranjem i postupak ekstrakcije ponovljen njegovim dodatkom od 6 mL. Nakon centrifugiranja supernatant je pripojen prvom etilacetatnom dijelu te je dodano 3 mL 0,26 M NaHCO₃. Slojevi su dobro promiješani i centrifugirani te je 0,8 mL donje vodene faze prebačeno u epruvetu i zagrijavano u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 5 min. Uzorak je lagano promućkan, ohlađen na sobnu temperaturu te razrijeđen sa 0,2 mL 0,225 M HCl i 1 mL 0,13 M NaHCO₃ te ukapavan u jažice ELISA kita.

Određivanje okratoksina A

Imunoenzimski ELISA test proveden je potpuno prema uputama proizvođača kita i uporabu automatiziranog analizatora ChemWell 2910 (Awareness Technologies, Inc, USA). Svi uzorci i standardi analizirani su u duplikatu. Nakon dodavanja svih komponenti kita reakcija je zaustavljena dodatkom 100 µL stop otopine te je apsorbancija izmjerena na 450 nm. Kod izračuna koncentracije okratoksina A u mesnim proizvodima, rezultati dobiveni iz kalibracijske krivulje pomnoženi su

s odgovarajućim faktorom razrjeđivanja. Provedba ELISA metode detaljno je opisana u istraživanju Perši i sur. (2014).

Validacija ELISA metode

Granica detekcije (LOD) i granica kvantifikacije (LOQ) dobiveni su dodavanjem tri odnosno deset vrijednosti standardne devijacije srednjoj vrijednosti 10 analiziranih uzoraka dobivenih od kontrolnih životinja. Iskorištenje metode utvrđeno je za mišićno tkivo na razini 2 µg/kg analizom deset obogaćenih uzoraka na istoj razini. Za određivanje ponovljivosti, ponovljeni su isti koraci kao i za određivanje iskorištenja, u istim uvjetima analize, još dva puta. Unutarlaboratorijska obnovljivost određena je na isti način kao i ponovljivost, promjenom serije ELISA kita, reagenasa i laboratorijskih uređaja.

Prehrambene navike i procjena izloženosti

Istraživanje o prehrambenim navikama provedeno je prema EFSA-inom vodiču „General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey” 2009; 7(12):1435. U istraživanju je korišten upitnik o učestalosti konzumacije (Food Frequency Questionnaire - FFQ), kako bi se dobile količine konzumiranih namirnica u g/dan te priručnik „Kvantitativni modeli namirnica i obroka” (Senta i sur., 2004.), kako bi se na temelju slika veličine porcija odredila količina u gramima (tzv. Picture book). Istraživanje je provedeno na reprezentativnom uzorku od 1000 ispitanika, a obuhvaćena je populacija starosti od 18-64 godine. Pri odabiru ispitanika vodilo se računa o raznim socio-demografskim parametrima kako bi uzorak bio reprezentativan (omjer selo-grad, spol, dob, regionalna pokrivenost i sl.). Svaki ispitanik navodio je konzumaciju za tri dana od čega dva radna dana (između kojih je razmak bio najmanje 2 tjedna) i jedan dan vikenda.

Za anketare je pripremljen „Priručnik za provođenje istraživanja na terenu” koji je sadržavao upute za anketare, upute za izbor kućanstva (grad, selo), upute za izbor ispitanika u kućanstvu, pravila anketiranja te posebne upute za istraživanje (tablica – način ispunjavanja).

Prije anketiranja provedena je edukacija koordinatora anketara te je provedena kontrola anketara na terenu. Prvi dio upitnika sadržavao je pitanja koja se odnose na socio-demografske parametre (regija, dob, spol, težina, visina, radni status, bračni status, edukacija, primanja i sl.) dok se drugi dio sastojao od tablice u kojoj su ispitanici navodili podatke o vremenu i mjestu konzumacije, namirnici, opisu namirnice, načinu pripreme, količinama koje su konzumirane, učestalosti konzumacije i raznim dodatnim informacijama (brand, domaći proizvodi i sl.). Kako bi se provela validacija upitnika na početku istraživanja napravljen je pilot projekt.

Uzimajući u obzir prehrambene navike i koncentracije okratoksina A u različitim mesnim proizvodima, dobivenim iz sirovina tretiranih životinja, procjena moguće izloženosti napravljena je pomoću računalnog softvera @ Risk® - Risk Analysis Add-in for Microsoft Excel, Ver.5.0.1: Standard Edition (Palisade Corporation, 2008). Razlike u prosječnim vrijednostima koncentracija okratoksina A u proizvedenim mesnim proizvodima su ispitane analizom varijance a one sa dobivenim p vrijednostima manjim od 0,05 smatrale su se statistički značajnim. Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa Statistica Ver. 7 software (StatSoft Inc. Tulsa, OK, 1984-2004, USA).

Rezultati i diskusija

U okviru validacije analitičke metode određivanja okratoksina A određeni su parametri iskorištenje, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost i to za mišićno tkivo kao glavni sastojak mesnih proizvoda. Iskorištenje metode iznosilo je 64,94% (CV = 24,9%) dok su koeficijenti varijacije (CV) za ponovljivost i unutarlaboratorijsku obnovljivost iznosili 24,62% odnosno 25,2%. Dobiveni validacijski rezultati ukazuju da se primijenjena metoda može koristiti za kvantitativno određivanje okratoksina A u mesnim proizvodima.

U Tablici 1. prikazane su vrijednosti limita detekcije (LOD), limita kvantifikacije (LOQ) te količine okratoksina A određene u različitim mesnim proizvodima proizvedenim od sirovina tretiranih životinja

Tablica 1.

Limit detekcije, limit kvantifikacije te količine okratoksina A (µg/kg) određene u istraživanim mesnim proizvodima.

Mesni proizvod ^a	LOD ^b (µg/kg)	LOQ ^c (µg/kg)	Količina okratoksina A u uzorcima Mean ±σ ^d (µg/kg)
Kulen	0,83	1,50	5,17±0,93
Slavonska kobasica	0,84	1,07	6,68±0,85
Panceta	0,30	0,37	6,29±0,64
Dimljena šunka	0,32	0,40	4,59±0,61
Dimljena rebra	0,33	0,46	5,71±0,69

a) Od svake vrste 10 proizvoda b) Limit detekcije c) Limit kvantifikacije d) Standardna devijacija

Najveća koncentracija okratoksina A, u mesnim proizvodima dobivenih od sirovina tretiranih životinja, utvrđena je u slavonskoj kobasici ($6,68 \pm 0,85 \mu\text{g/kg}$), dok je najniža koncentracija ($4,59 \pm 0,61 \mu\text{g/kg}$) pronađena u dimljenoj šunki. U ostalim mesnim proizvodima koncentracija okratoksina A kretala se u rasponu od $5,17 \mu\text{g/kg}$ do $6,29 \mu\text{g/kg}$. Prethodno istraživanje provedeno na domaćim suhim kobasicama, tipa slavonska kobasica, a koji su prikupljeni na tržištu u Republici Hrvatskoj (Frece i sur., 2010) pokazalo je da se koncentracija okratoksina A u ovoj vrsti kobasica može kretati u rasponu od $1,0$ do $4,7 \mu\text{g/kg}$. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju, za slavonsku kobasicu, u skladu su s istraživanjima Frece i sur. (2010). Istraživanje Dall'Asta i sur. (2010) provedeno na svinjama tretiranim s okratoksinom A tijekom 40 dana, u dozi od $0,68 \text{ mg}$ na dan, pokazalo je da se okratoksin A može detektirati u uzorcima dimljene šunke. Raspon koncentracija iznosio je od $1,25$ do $5,65 \mu\text{g/kg}$, što je slično koncentracijama za isti proizvod dobivenim u ovom istraživanju ($4,59 \mu\text{g/kg}$). Za ostale proizvode obuhvaćene ovim istraživanjem ne postoje literaturni podaci, što se može objasniti regionalnim karakterom pripremljenih proizvoda, a posebice kulena kao tradicionalnog mesnog proizvoda u Hrvatskoj.

Okratoksin A može ući u humani hranidbeni lanac na nekoliko načina. Žitarice i proizvodi od žitarica pogodni su supstrat za razvoj plijesni, posljedično produkciju mikotoksina, pa tako i okratoksina A. Kako žitarice predstavljaju važnu komponentu u humanoj prehrani, a koriste se i za hranidbu životinja, moguć je direktan unos okratoksina A putem kontaminiranih žitarica, ali i putem mesa i mesnih proizvoda dobivenih od životinja hranjenih kontaminiranim krmnim smjesama (Petzinger i Weidenbach, 2002). Kako u Republici Hrvatskoj postoji tradicija pripreme i konzumacije tradicionalnih mesnih proizvoda, a ranija istraživanja pokazala su učestalu kontaminaciju žitarica i krmnih smjesa sa okratoksinom A (Domijan, 2005; Pepelnjak i sur., 2008) važno je utvrditi moguću izloženost ljudi okratoksinu A putem konzumacije mesnih proizvoda. Pri tom je važno istaknuti da se u proizvodnji ovih proizvoda ne koriste iznutrice (bubreg,

jetra), a za koje je u ranijim istraživanjima utvrđeno da kumuliraju ostatke okratoksina A na najvećim razinama, značajno većim u odnosu na mišićno i masno tkivo (Perši i sur., 2014), te stoga općenito predstavljaju i najznačajniji izvor kontaminacije mesnih proizvoda.

Za procjenu moguće izloženosti okratoksinu A prosječni unos mesnih proizvoda određen je putem upitnika učestalosti konzumacije (FFQ), a rezultati za različite proizvode od mesa prikazani su u Tablici 2.

Podaci su pokazali da se, za navedene mesne proizvode, najveći prosječni unos odnosi na dimljena rebra te kulen, a iznosi $58,5 \text{ g/dan}$ odnosno $53,1 \text{ g/dan}$.

Za procjenu rizika dva su moguća pristupa: kvalitativni i kvantitativni (FAO/WHO, 1995; CAC, 1999). Kvalitativna procjena rizika predstavlja opisni ili kategorijski postupak s informacijama, dok kvantitativni pristup predstavlja matematičku analizu numeričkih podataka. Kvantitativna procjena rizika ima prednosti pogotovo ako postoje potrebne informacije i podaci, međutim u nedostatku toga ili nekog vremenskog ograničenja preostaje samo opcija kvalitativne procjene rizika. Kvantitativna procjena rizika može se nadalje podijeliti u dvije kategorije: determinističku i stohastičku odnosno „point-estimate“ i probabilističku procjenu rizika. Osnovna razlika između njih je u ulaznim podacima za procjenu rizika. Pristup koji uzima u obzir pojedini podatak poput prosječne vrijednosti je „point-estimate“ (deterministički) dok probabilistički (stohastički) razmatra sve dostupne podatke i koristi vjerojatnosti raspodjele u odnosu na pojedinačne vrijednosti pri opisivanju parametara koji pridonose riziku iz čega proizlazi i raspodjela rizika odnosno opseg rizika bilo na pojedincu ili na populaciji. Stoga karakterizacija rizika uključuje promjenljivost (varijabilnost) i nesigurnost (Lammerding i Fazil, 2000).

Na temelju gore dobivenih eksperimentalnih podataka napravljena je procjena izloženosti „point-estimate“ determinističkim pristupom (Brera i sur., 2011) koji je uključio pojedinačne prosječne koncentracije okratoksina A u proizvodima napravljenim iz sirovine kontaminiranih životinja i podataka istraživanja HAH-a o prehrambenim navikama i konzumaciji pojedinih

Tablica 2.
Prosječni unos određenih vrsta mesnih proizvoda (g/dan) u Hrvatskoj (Hrvatska agencija za hranu, 2011-2012)

	Mesni proizvod (g/dan)				
	Kulen	Slavonska kobasica	Panceta	Dimljena šunka	Dimljena rebra
Srednja vrijednost	53,1	27,3	33,4	26,2	58,5
SD	76,4	26,4	34,4	36,3	50,1
Median	30,8	18,0	25,0	16,0	46,5
Mode	36,0	12,0	36,0	18,0	100,0
Min	1,4	1,4	0,2	0,8	4,5
Max	400,0	96,0	200,0	214,0	160,0

Tablica 3. Tjedni unos okratoksina A procijenjen na temelju udjela u mesnim proizvodima proizvedenim od sirovina tretiranih životinja, prosječne tjelesne mase muškaraca i žena i dijetetskim podacima Hrvatske agencije za hranu o unosu tih proizvoda.

Vrsta proizvoda	Prosječna koncentracija ($\mu\text{g/kg}$)	Dnevna konzumacija (g)		Tjedni unos (ng/kg TM / tjedno)	
Kulen	5,17	prosječno	53,1	prosječno	27,45
		maksimum	400,0	maksimalno	206,80
Slavonska kobasica	6,68	prosječno	27,3	prosječno	18,24
		maksimum	96,0	maksimalno	64,13
Panceta	6,29	prosječno	33,3	prosječno	20,95
		maksimum	200,0	maksimalno	125,80
Dimljena šunka	4,59	prosječno	26,2	prosječno	12,03
		maksimum	214,0	maksimalno	98,23
Dimljena rebra	5,71	prosječno	58,5	prosječno	33,40
		maksimum	160,0	maksimalno	91,36

prehrambenih proizvoda (HAH, 2011-2012) te uzimajući u obzir tjelesnu masu potrošača od 70 kg (EFSA Scientific Committee, 2012). Dobivene su TWI (podnošljivi tjedni unos) vrijednosti izražene u nanogramima okratoksina A po kilogramu tjelesne mase i tjednu i uspoređene s TWI referentnim vrijednostima EFSA-e (EFSA, 2006).

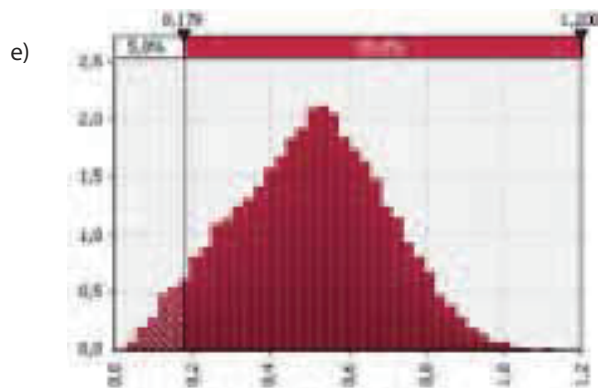
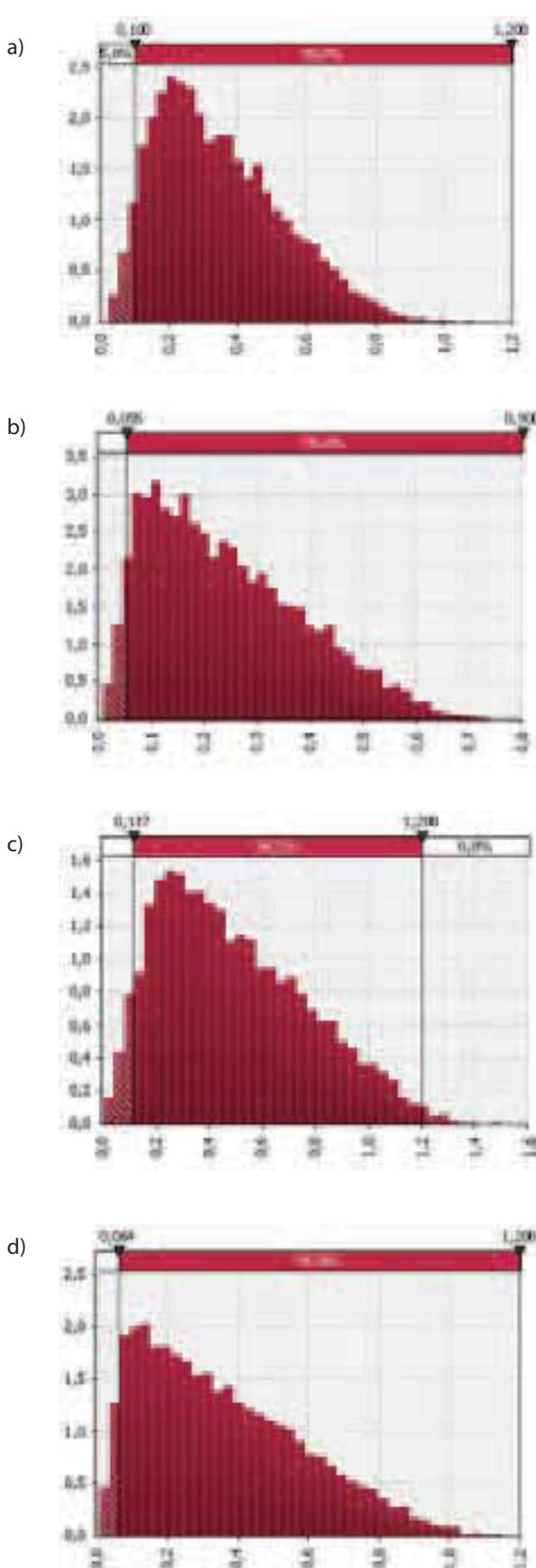
Uspoređujući dobivene rezultate s referentnom vrijednosti od 120 ng/kg tjelesne mase/tjedno (EFSA, 2006) proizlazi da bi tjedna izloženost hrvatske populacije oba spola bila daleko ispod dozvoljene granice pri konzumaciji bilo koje vrste istraživanih mesnih proizvoda dobivenih iz sirovina tretiranih životinja. Ako bi se pri procjeni izloženosti u proračun uzele maksimalne vrijednosti konzumacije svakog od istraživanih proizvoda, rizik bi predstavljala konzumacija kulena i pancete.

Ako se podaci o prosječnom unosu pojedine vrste mesnih proizvoda prikažu s trokutnom raspodjelom a koncentracija okratoksina A u tim istim vrstama mesnih proizvoda proizvedenim iz sirovina tretiranih životinja normalnom raspodjelom uz korištenje Monte Carlo simulacije (10000 iteracija) može se dobiti krivulja vjerojatnosti izloženosti okratoksinu A za svaki istraživani mesni proizvod (Slika 1.). Na apscisi su brojčane iskazane iteracije, a na ordinati su prikazani unosi okratoksina A iz pojedinih proizvoda preračunati na dnevni unos za osobu težine 70 kg s obzirom na prosječni dnevnu konzumaciju proizvoda.

Dobiveni rezultati pokazali su da je vjerojatnost izlaganja okratoksinu A u dozi koja je iznad TWI (120 ng/kg TM tjedno) vrlo niska. Podaci za kulen, slavonsku kobasicu, šunku i dimljena rebra ukazuju da je mala vjerojatnost da će stanovništvo (prosječne tjelesne mase 70 kg) biti izloženo okratoksinu A u dozama većim

od TWI ako konzumira kontaminirane proizvode. Za razliku od tih proizvoda podaci za pancetu pokazali su da postoji vjerojatnost da 0,8% populacije bude izloženo okratoksinu A u dozi koja je viša od TWI pri konzumaciji tog proizvoda. Razlika u izloženosti između pojedinih vrsta mesnih proizvoda može se objasniti različitim prosječnim unosom pojedinih proizvoda, a i statistički značajnom razlikom u koncentraciji okratoksina A određenoj u tim proizvodima ($p < 0,05$).

Istraživanja koja se odnose na procjenu ljudske izloženosti okratoksinu A objavljena su za različite skupine hrane (Bakker, 2002; Milićević i sur., 2012; Duarte i sur., 2012), ali podaci za proizvode od mesa su nedostadni. Studija provedena u Nizozemskoj (RIVM, 2003) pokrivala je neke skupine namirnica za koje je karakteristična kontaminacija sa okratoksinom A. Podaci su pokazali da meso doprinosi ukupnom unosu okratoksina A sa 8%, te da taj doprinos zajedno sa konzumacijom žitaricama, kave i crnog vina iznosi 79% od ukupnog unosa okratoksina A. Druga studija koja procjenjuje moguću ljudsku izloženost ovom mikotoksinu kroz analizu mesa (Milićević i sur., 2012) pokazala je da meso svinja i peradi ne predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje. Istraživanje u Italiji (Toscani, 2007), provedeno na uzorcima dimljenih šunki pokazalo je da koncentracija okratoksina A u uzorcima sušene šunke može iznositi i do 7,28 $\mu\text{g/kg}$, s učestalošću kontaminiranih uzoraka od 50%. Niti jedno od tih istraživanja nije uključivalo procjenu izloženost okratoksinu A kroz prehrambene navike već su rezultati interpretirani u skladu sa učestalošću kontaminacije i koncentraciji okratoksina A određenoj u pojedinim skupinama hrane ili proizvodima.



Slike 1. Vjerojatnost izloženosti potrošača okratoksinu A pri konzumaciji mesnih proizvoda dobivenih iz sirovina tretiranih životinja i to: a) kulena, b) slavonske kobasice, c) pancete, d) dimljene šunke, e) dimljenih rebara.

Zaključak

Uzimajući u obzir prehrambene navike i koncentracije okratoksina A u različitim mesnim proizvodima dobivenim iz sirovina tretiranih životinja, procijenjena je moguća izloženost okratoksinu A. Podaci su pokazali da bi samo konzumiranjem pancete 0,8% populacije bilo izloženo okratoksinu A u dozi koja je iznad TWI vrijednosti od 120 ng/g TM tjedno, a koja je definirana od strane EFSA. Za ostale proizvode koji su obuhvaćeni ovim istraživanjem ne postoji vjerojatnost izloženosti ljudi dozi koja je iznad TWI vrijednosti. Tradicionalni hrvatski mesni proizvodi, u čijoj se proizvodnji ne koriste iznutrice koje akumuliraju ostatke ovog mikotoksina u značajno većim razinama, ne predstavljaju značajan izvor okratoksina A u ljudskoj prehrani, te je stoga rizik za ljudsko zdravlje uslijed konzumiranja ove vrste proizvoda zanemariv.

Literatura

- Amezequa, S., G.E. Penas, M.M. Arbizu, A.L. De Certain (2009): Ochrotoxin A decontamination: A review, *Food Cont.* 20, 326-333.
- Bakker, M., M.N. Pieters (2002): Risk Assessment of Ochrotoxin A in the Netherlands. RIVM report 388802025/2002.
- Brera, C., F. Debegnach, B. De Santis, E. Iafrate, E. Pannunzi, C. Berdini, E. Prantera, E. Gregori, M. Miraglia (2011): Ochrotoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. *Food Cont.* 22, 1663-1667.
- CAC (Codex Alimentarius Commission) (1999): Principles and guidelines for the conduct of a microbiological risk assessment. FAO, Rome- CAC/GL-30.
- Creppy, E.E., A. Kane, G. Dirheimer, C. Lafarge-Frayssinet, S. Mousset, C. Frayssinet (1985): Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand breaks evaluation in spleen, liver and kidney. *Tox. Lett.* 28, 29-35.
- Creppy, E.E. (1999): Human ochratoxicosis. *J. Toxicol., Toxin. Rev.* 18, 277-293.
- Dall'Astra, C., G. Galaverna, T. Bertuzzi, A. Moseriti, A. Pietri, A. Dossena, R. Marchelli R (2010): Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food Chem.* 120, 978-983.
- Domijan, A.M., M. Peraica, Ž. Jurjević, D. Ivić, B. Cvjetković (2005): Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. *Food Addit. Cont.* 22, 677-680.
- Duarte, S.C., M. Lino, A. Pena (2012): Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *The Vet. J.* 192, 286-292.
- EFSA Scientific Committee (2012): Scientific opinion: Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific panels and Units in the absence of actual measured data. *EFSA Journal* 10, (3) 2579.
- FAO/WHO (1995): Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO, Geneva. WHO/FNU/FOS/95.3.
- Frece, J., J. Pleadin, K. Markov, N. Peršić, V. Đukić, D. Čvek, F. Delaš (2010): Mikrobna populacija, kemijski sastav i mikotoksini u kobasicama s područja Varaždinske županije. *Vet. stanica* 41, 189-198.
- Gareis, M. (1996): Fate of ochratoxin A on processing of meat products.

Food Addit. Cont. 13, 35-37.

Gareis, M., R. Scheuer (2000): Ochratoxin A in meat and meat products. Arch. Lebensmittelhygiene 51, 102-104.

Hrvatska agencija za hranu (HAH) „Nacionalno istraživanje o prehranbenim navikama“ 2011-2012, neobjavljeni podaci.

Jørgensen, K. (1998): Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. Food Addit. Cont. 15, 550-554.

Khouri, EA., A. Atoui (2010): Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. Toxins 2, 461-493.

Krogth, P., F. Elling, Chr. Friis, B. Hald, AE. Larensen, EB. Lillehøj, A. Madsen, HP. Mortensen, F. Rasmussen, U. Ravnskov (1979): Porcine Nephropathy Induced by long-term ingestion of ochratoxin A. Vet. Pathol. 16, 466-475.

Lammerding, A.M., A. Fazil (2000): Hazard identification and exposure assessment for microbial food safety risk assessment. Int. J. Food Microbiol. 58, 147-157.

Madsen, A., HP. Mortensen, B. Hald (1992): Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs- Part 2. Acta Agr. Scand. A-AN 32, 369-372.

Markov, K., J. Pleadin, M. Bevardi, N. Vahčić, D. Sokolić-Mihalak, J. Frece (2013):

Natural occurrence of aflatoxin B1, ochratoxin A and citrinin in Croatian fermented meat products. Food Cont. 34, 312-317.

Miličević, DR., S. Stefanović, S. Janković, T. Radičević (2012): Risk analysis

and exposure assessment of Ochratoxin A in Serbia. Vet. World 5, 412-416. Pepeljnjak, S., Z. Cvetnić, M. Segvić Klarić (2008): Okratoksin A i zerealne: Kontaminacija žitarica i krmiva u Hrvatskoj (1977-2007) i utjecaj na zdravlje životinja i ljudi. Krmiva 50, 147-159.

Perši, N., J. Pleadin, D. Kovačević, G. Scortichini, S. Milone (2014) Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. Meat sci. 96, 203-210.

Petzinger, E., A. Weidenbach (2002): Mycotoxin in feed chain: the role of ochratoxin. Livest. Prod. Sci. 76, 245-250.

Pfohl-Leszkowicz, A., AR. Manderville (2007): Review Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Mol. Nutr. Food Res. 51, 61-99.

Pleadin, J., N. Perši, D. Kovačević, N. Vahčić, G. Scortichini, S. Milone (2013): Ochratoxin A in traditional dry-cured meat products produced from sub-chronic exposed pigs. Food Addit. Cont. A 30, 1837-1848.

Senta, A., J. Pucarini-Cvetković, J. Doko Jelinić (2004): Kvantitativni modeli namirnica i obroka. Medicinska naklada. Zagreb, 2004.

Toscani, T., A. Moseriti, A. Dossena, C. Dall'Asta, N. Simoncini, R. Virgili (2007): Determination of ochratoxin A in dry-cured meat products by a HPLC-FLD quantitative method. J. Chrom. B 855, 242-248.

Walker, R., JC. Larsen (2005): Ochratoxin A: Previous risk assessments and issues arising. Food Addit. Cont., Supplement 1, 6-9.

Dostavljeno: 10.3.2014.

Prihvaćeno 20.3.2014.

Einschätzung der möglichen Ausgesetzttheit dem Ochratoxin A durch die Konsumation der Fleischprodukte

Zusammenfassung

Ochratoxin A ist der sekundäre toxische Metabolit, den die Schimmelsorten *Aspergillus* und *Penicillium* erzeugen. Die Angaben weisen auf eine häufige Ochratoxin A - Kontamination der Getreide und der Getreideerzeugnisse hin, und demzufolge eine mögliche Kontamination von Fleisch und Fleischerzeugnissen. Das Ziel dieser Untersuchung war, das mögliche Niveau der Ausgesetzttheit der Konsumenten dem Ochratoxin A durch die Konsumation der traditionellen Fleischerzeugnisse, kontaminiert mit diesem Toxin, festzustellen. In Betracht ziehend die Ernährungsgewohnheiten und die Ochratoxinkonzentrationen in verschiedenen Fleischerzeugnissen stammend aus den Rohstoffen von trütierten Tieren, wurde die Möglichkeit der Ausgesetzttheit dem Ochratoxin A eingeschätzt. Die Resultate haben gezeigt, dass die mögliche Ausgesetzttheit dem Ochratoxin A in der Dose über TWI (120 ng/kg TM wöchentlich) niedrig ist. Die Resultate haben gezeigt, dass nur durch die Konsumation von „panceta“ (Speck) 0,8 % der Population dem Ochratoxin A ausgesetzt ist, in der Dose die über TWI Werte von 120 ng/g TM wöchentlich liegt, was seitens EFSA definiert wurde. Die Angaben für „Kulen“ (Dauerwurst aus Schweinefleisch von bester Qualität), slawonische Würste, Schinken und geräucherte Rippen weisen darauf hin, dass es eine geringe Möglichkeit gibt, für die Bevölkerung (durchschnittliche Körpermasse 70 kg) für die Ausgesetzttheit dem Ochratoxin A in Dosen größer als TWI, wenn sie kontaminierte Erzeugnisse konsumiert.

Schlüsselwörter: Ochratoxin A, Fleischerzeugnisse, Ausgesetzttheit, Tolerable Weekly Intake, ELISA

Evaluación de posible exposición a ocratoxina A por la consumación de productos cárnicos contaminados

Resumen

Ocratoxina A es el metabolito secundario tóxico producido por los hongos de géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Los datos indican la contaminación frecuente de los cereales y productos cereales y consiguientemente posible contaminación de carne y productos cárnicos por ocratoxina A. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel posible de exposición de consumidores a la ocratoxina A por la consumación de productos cárnicos tradicionales contaminados por esta toxina. Tomando en cuenta las costumbres alimentarias y la concentración de la ocratoxina A en varios productos cárnicos provenientes de carne cruda de los animales medicados, se ha estimado la exposición potencial a ocratoxina A. Los resultados mostraron que la probabilidad de la exposición a ocratoxina A en las dosis por encima de TWI/IST (120 ng/kg del PC por la semana) es muy baja. Los datos muestran que con tan solo consumir panceta 0,8% de la población podría estar expuesta a ocratoxina A en la dosis por encima del valor de la TWI/IST de 120 ng/kg por la semana del PC definida por JECFA. Los datos sobre kulen, salchicha de Eslovenia, jamón ahumado y costilla ahumada indican que es poco probable que la población (con el PC promedio de 70 kg) sea expuesta a ocratoxina A en las dosis por encima de TWI/IST si consuma los productos contaminados.

Palabras claves: ocratoxina A, productos cárnicos, exposición, Tolerable Weekly Intake/Ingesta Semanal Tolerable, ELISA

Valutazione della possibile esposizione all'ocratossina A mediante la consumazione di prodotti della carne contaminati

Riassunto

L'ocratossina A è un metabolita tossico secondario prodotto da specie dei generi delle muffe *Aspergillus* e *Penicillium*. I dati mostrano la frequente contaminazione dei cereali e dei prodotti del frumento e, di conseguenza, la possibile contaminazione delle carni e dei prodotti della carne. Questa ricerca è stata condotta con lo scopo di accertare il possibile livello di esposizione dei consumatori all'ocratossina A mediante la consumazione dei prodotti della carne tradizionali contaminati da questa tossina. La possibile esposizione all'ocratossina A è stata valutata prendendo in considerazione le abitudini alimentari e la concentrazione di ocratossina A in vari prodotti della carne ottenuti da materie prime degli animali trattati. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la probabilità di esposizione all'ocratossina A in una dose superiore a TWI (120 ng/kg TM la settimana) è molto bassa. I dati hanno dimostrato che soltanto la consumazione della pancetta ha esposto lo 0,8% della popolazione all'ocratossina A in una dose superiore a 120 ng/kg TM la settimana (in base ai dati EFSA). I dati sul salame kulen, la salsiccia della Slavonia, il prosciutto cotto e le costine di maiale affumicate, invece, hanno evidenziato una bassa probabilità che la popolazione (composta d'individui con massa corporea di 70 kg), una volta consumati i prodotti contaminati, possa essere esposta all'ocratossina A in una dose superiore a TWI.

Parole chiave: ocratossina A, prodotti della carne, esposizione, Tolerable Weekly Intake, ELISA